

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 20, 1982, pp. 305–312

Zur enzymatischen Analytik des HDL-Sphingomyelin

Von H. Schriewer, H.-U. Jabs und G. Assmann

Zentrallaboratorium der Medizinischen Einrichtungen der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
und Institut für Arterioskleroseforschung an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

(Eingegangen am 28. Juli/25. November 1981)

Zusammenfassung: Es wird eine einfach durchzuführende enzymatische Bestimmungsmethode für Sphingomyelin im Apolipoprotein B-freien Überstand nach Fällung von Blutseren mit Phosphorwolframsäure/ MgCl_2 (HDL-Sphingomyelin) beschrieben. Das Analysenprinzip beruht auf der durch Sphingomyelinase aus *B. cereus* katalysierten Spaltung von Sphingomyelin in Phosphorylcholin und N-Acylsphingosin und der anschließenden Freisetzung von Cholin aus Phosphorylcholin mittels alkalischer Phosphatase. Die Analytik von Cholin erfolgt mittels Cholin kinase im optischen Test.

Die mit der enzymatischen Methode ermittelten Sphingomyelinwerte stimmen gut mit den Werten überein, die mit der konventionellen chemischen Methode gemessen werden. Weiterhin findet man mit der enzymatischen Methode in der durch Ultrazentrifugation isolierten HDL-Fraktion (1,063–1,21 kg/l) und der nach Fällung Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine isolierten Überstandsfraktion übereinstimmende Werte.

The enzymatic analysis of sphingomyelin in HDL

Summary: A simple method is described for the enzymatic determination of sphingomyelin in the apolipoprotein B-free supernatants prepared by precipitation of blood sera with phosphotungstate/ MgCl_2 . The analysis is based on the enzymatic hydrolysis of sphingomyelin, by sphingomyelinase from *B. cereus*, into phosphorylcholine and N-acylsphingosine, and subsequent hydrolysis of phosphorylcholine by alkaline phosphatase. The choline formed is determined by choline kinase in an optical test.

The results from this method were in good agreement with those obtained by the conventional chemical sphingomyelin determination. Furthermore, there was a good correlation between the sphingomyelin concentrations obtained from the HDL fractions isolated by ultracentrifugation (1.063–1.21 kg/l) and those obtained from the apolipoprotein B free supernatants after phosphotungstate/ MgCl_2 precipitation of sera.

Einführung

Die Analytik der High Density-Lipoproteine (HDL) als Risikoindikator der koronaren Herzkrankheit hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen (1, 2). Das bisher am breitesten angewandte Verfahren der „HDL-Quantifizierung“ beruht auf der Bestimmung des Cholesterins im Präzipitationsüberstand nach Fällung Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine mit Polyanionen in Verbindung mit divalenten Kationen. Infolge der Heterogenität der HDL als Partikelgruppe mit unterschiedlicher Komposition, unterschiedlichem Metabolismus und unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften kann man jedoch vom HDL-Cholesterinwert nicht ohne weiteres auf die HDL-Masse (und vice versa) schließen. HDL-Partikel bestehen etwa zu 50% aus Proteinen, zu 25–30% aus Phospho-

lipiden, zu 10–20% aus Cholesterin und Cholesterinestern und zu 3–5% aus Triglyceriden. Obwohl der Phospholipidgehalt der HDL höher als der Cholesteringehalt dieser Partikel ist, hat die Bestimmung der HDL-Phospholipide oder die Bestimmung der einzelnen Phospholipidfraktionen der HDL bisher wegen der aufwendigen Analytik keinen Eingang in die Routine gefunden.

Durch die Einführung kommerziell verfügbarer, spezifisch wirkenden Phospholipasen sowie der in letzter Zeit entwickelten empfindlichen Bestimmungsmethoden für Cholin ist es möglich, relativ rasch und einfach verschiedene cholinhaltige Phospholipidfraktionen zu analysieren. Über die Analytik von Phosphatidylcholin im Fruchtwasser (3, 4) oder der gesamten cholinhaltigen Phospholipide im Blutserum (5) mit enzymatischen Bestimmungsv erfahren liegen bereits Erfahrungen vor.

Eine enzymatische Analytik der Subfraktionen des Phospholipidanteils der HDL (Phosphatidylcholin, Sphingomyelin, Lysophosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und andere) wurde bisher noch nicht durchgeführt. Die bisherigen epidemiologischen und klinischen Ergebnisse bezüglich der Analytik von HDL-Cholesterin und HDL-Apolipoproteinen (6, 7) lassen vermuten, daß auch die differenzierte Phospholipidanalytik dieser Partikel die Frühdiagnostik und Prognostik der koronaren Herzkrankheit verbessern sollte. Wir möchten im folgenden über ein vollenzymatisches Sphingomyelin-Bestimmungsverfahren berichten, das wir zur Analytik von Sphingomyelin im Präzipitationsüberstand nach Fällung Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine mit Phosphorwolframsäure/MgCl₂ ("HDL-Sphingomyelin") entwickelt haben.

Material und Methoden

Substanzen

[Methyl-¹⁴C]Cholin spezifische Aktivität 2,2 GBq/mmol, Amersham Buchler, Braunschweig

Phosphorwolframsäure/MgCl₂ Fällungsreagenz, Boehringer Mannheim, Test Nr. 400971

Sphingomyelinase aus *B. cereus* (Sphingomyelin choline-phosphohydrolase, EC 3.1.4.12), Boehringer Mannheim, Bestell-Nr. 396753

Alkalische Phosphatase, spezifische Aktivität 65 U/mg (Orthophosphoric-monoester phosphohydrolase (alkaline optimum) EC 3.1.3.1), Boehringer Mannheim, Bestell-Nr. 108162

Cholinkinase aus Hefe, spezifische Aktivität 0,5 U/mg (ATP: choline-phosphotransferase, EC 2.7.1.32), Boehringer Mannheim, Bestell-Nr. 348651

Lactatdehydrogenase, spezifische Aktivität 550 U/mg bei 25 °C aus Kaninchenmuskel (*L*-Lactate: NAD oxidoreductase, EC 1.1.1.27) Boehringer Mannheim, Bestell-Nr. 127330

Pyruvatkinase, spezifische Aktivität 200 U/mg bei 25 °C aus Kaninchenmuskel (ATP: pyruvate 2-O-phosphotransferase, EC 2.7.1.40), Boehringer Mannheim, Bestell-Nr. 127418

Probenmaterial

Als Versuchsmaterial wurden Seren aus der Untersuchungsreihe „Prospektive epidemiologische Studie bei Betriebsangehörigen im Raum Westfalen“ verwandt. Die Blutabnahme erfolgte morgens nüchtern in einem speziell hierfür eingerichteten Omnibus. Das gewonnene Serum wurde bei +4 °C aufbewahrt und traf spätestens 3 Tage nach der Blutabnahme in unser Laboratorium ein. Die Analytik erfolgte innerhalb von 24 Stunden nach Erhalt der Serumproben.

HDL-Isolierung durch Ultrazentrifugation

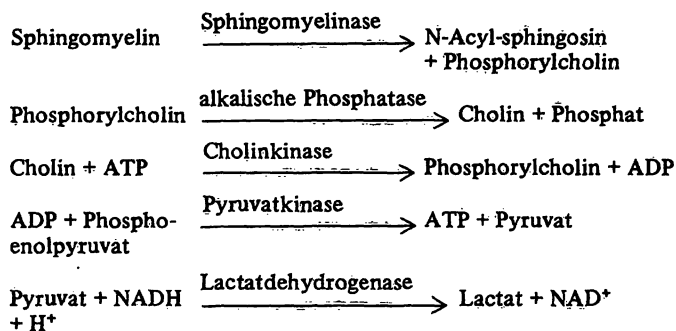
Die Ultrazentrifugation wurde im 40.3-Rotor (Beckman Instruments) durchgeführt. 3 ml der Serumproben wurden mit einer 0,15 mol/l NaCl enthaltenden Lösung auf 5 ml verdünnt, mit festem Kaliumbromid auf eine Dichte von 1,063 kg/l eingestellt, mit einer 1,063 kg/l Kaliumbromid enthaltenden Lösung überschichtet und 24 Stunden bei +4 °C bei 36 000 min⁻¹ zentrifugiert. Die durch „Schneiden“ der Röhren gewonnenen Fraktionen der Dichte > 1,063 kg/l wurden mit einer 1,063 kg/l KBr-enthaltenden Lösung auf 5 ml verdünnt, mit festem Kaliumbromid auf eine Dichte von 1,21 kg/l eingestellt, mit einer 1,21 kg/l KBr-enthaltenden Lösung überschichtet und 48 Stunden bei 36 000 min⁻¹ zentrifugiert. Die HDL-Fraktionen 1,063–1,21 kg/l wurden nach erschöpfender Dialyse gegen 0,15 mol/l NaCl mit der genannten NaCl-Lösung auf das Ursprungsvolumen von 3 ml aufgefüllt und bei 4 °C aufbewahrt.

HDL-Isolierung durch Präzipitation Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine

Die Präzipitation Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine erfolgte mit Phosphorwolframsäure/MgCl₂ mit der Testkombination Boehringer Mannheim Nr. 400971 (2): 1 ml Blutserum wurde mit 0,1 ml Fällungsreagenz versetzt (Phosphorwolframsäure-Konzentration 3,64 g/l, MgCl₂-Konzentration 45,5 mmol/l) und 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde 30 min bei 4 °C und etwa 1500 g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde zur enzymatischen Sphingomyelinbestimmung eingesetzt.

Enzymatische Sphingomyelinbestimmung

Die enzymatische Sphingomyelinbestimmung wurde, wenn nicht anders beschrieben, nach folgendem Prinzip durchgeführt:



1. Enzymatische Spaltung von Sphingomyelin

In Reaktionsgefäße (Sarstedt Nr. 52690) wurden pipettiert:

0,5 ml Glycinpuffer (0,2 mol/l Glycin, 10 mmol/l MgSO₄ × 7 H₂O, 0,1 g/l Natriumdodecylsulfat, pH 8,0)
0,9 ml 0,15 mol/l NaCl
0,1 ml Probe
0,02 ml Sphingomyelinase (2 U)
0,01 ml alkalische Phosphatase (6,5 U).

Ein Reagenzienleerwert enthält statt Probe ein entsprechendes Volumen 0,15 mol/l NaCl. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, anschließend 10 Minuten im Thermoblock bei 95 °C erhitzt und die denaturierten Proteine nach Abkühlung der Lösung auf Raumtemperatur in einer Eppendorf-Zentrifuge 3200 abzentrifugiert.

2. Enzymatische Messung des freigesetzten Cholins

1 ml des erhaltenen Überstandes von Probenansatz bzw. Reagenzienleerwertansatz wurden in Eppendorf-Küvetten (Nr. 4071306.009) überführt,

0,050 ml Coenzymlösung (4 mmol/l NADH, 20 mmol/l ATP, 7 mmol/l Phosphoenolpyruvat (kristallisiertes Tricyclohexylammoniumsalz), 45 mmol/l Glucose), 0,010 ml Pyruvatkinase/Lactatdehydrogenase-Gemisch (je ≥ 300 kU/l) hinzugefügt; der Reaktionsansatz gut gemischt und nach 10 Minuten Inkubation bei 37 °C die Absorption A₁ bei 365 nm gemessen (Messung gegen H₂O). Anschließend wurden

0,025 ml Cholinkinase (2 kU/l) hinzupipettiert, die Lösung gut gemischt und nach 30 Minuten Inkubation A₂, nach weiteren 30 Minuten A₃ gemessen.

3. Berechnung der Sphingomyelinkonzentration

$$\Delta A (\text{Probe, Leerwert}) = (A_1 - A_2) - (A_2 - A_3)$$

$$\Delta A = \Delta A_{\text{Probe}} - \Delta A_{\text{Leerwert}}$$

$$\text{Konzentration} = \frac{\Delta A \times 1,53 \times 1,085 \times 1,1}{3,44 \times 1 \times 0,1} \quad [\text{mmol/l}]$$

Bei der HDL-Isolierung mittels Ultrazentrifugation entfällt der Verdünnungsfaktor 1,1.

Messung der Cholinkinasereaktion

0,1 ml des nach Fällung Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine aus Serum mit Phosphorwolframsäure/MgCl₂ erhaltenen Überstandes wurden mit 1 ml Glycinpuffer (siehe oben) versetzt, 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und die Serumproteine 15 Minuten bei 95 °C denaturiert. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und zum Überstand 0,185 mg Cholin, [Methyl-¹⁴C]-Cholin (etwa 400 Imp./min) und 0,1 U Cholinase gegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 95 °C unterbrochen. Die Inkubation eines entsprechenden Blindwertes erfolgte ohne Anwesenheit von Cholinase.

0,02 ml des Reaktionsansatzes wurden auf Whatman 3 MM Chromatographiepapier aufgetragen und das Chromatogramm im Laufmittel Isopropanol-Trichloressigsäure-0,27 kg/kg NH₃ (Volumina, 75 ml + 25 ml + 0,3 ml) über 11 cm entwickelt. Nach dem Trocknen wurde das Chromatogramm in 0,5 cm breite Streifen zerschnitten, in Szintillationsröhrchen übergeführt und die Radioaktivität nach Zugabe von 1 ml H₂O und 4 ml Unisolve I (Zinsser, Frankfurt) im Szintillationszähler gezählt.

Sphingomyelinbestimmung nach dünnschichtchromatographischer Trennung der Phospholipide

1. Phospholipidextraktionen

Die Phospholipidextraktionen aus dem Überstand von Seren nach Fällung Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine mit Phosphorwolframsäure/MgCl₂ erfolgte nach *Sundler et al.* (8). 1 ml Probe wurde mit dem 4-fachen Volumen Chloroform-Methanol (1 + 1) versetzt und intensiv geschüttelt. Nach 12 Stunden wurden die denaturierten Proteine abzentrifugiert und der Überstand abgetrennt. Der Überstand wurde nochmals extrahiert, die Unterstände vereinigt und mit 4 ml 0,15 mol/l NaCl versetzt. Die Chloroformphase wurde durch Zentrifugation abgetrennt, im N₂-Strom zur Trockne gebracht und in 0,050 ml Chloroform aufgenommen. Pro Einzelanalyse wurden hiervon 0,005 ml (entsprechend 10–20 µg Sphingomyelin) dünnschichtchromatographisch aufgetrennt.

2. Dünnschichtchromatographie der Phospholipide

Die analytische Trennung von Phospholipiden wurde auf HPTLC-Platten mit Konzentrierungszone (Kieselgel 60, Merck Darmstadt, Nr. 13748, 10 × 10 cm) durchgeführt. Als Laufmittel diente Chloroform-Methanol-Wasser (Volumina, 60 ml + 25 ml + 4 ml) bei Kammerättigung. Zur Darstellung der getrennten Fraktionen wurde die Platte mit einer 100 g/l ethanolischen Molybdätophosphorsäurelösung besprüht, bei 140 °C 15 Minuten erhitzt und die nicht mit dem Reagenz blau gefärbten Zonen mit Ammoniakdämpfen entfärbt.

Zur präparativen Abtrennung von Sphingomyelin wurden die getrennten Fraktionen in einem geschlossenen Gefäß mit Iod eingefärbt, markiert und die sphingomyelinhaltigen Positionen nach Abkratzen mit einer Rasierklinge in Zentrifugierröhrchen überführt. Die Elution aus dem Kieselgel erfolgte nach *Skipiski* (9).

3. Phosphatbestimmung

Die Phosphatbestimmung nach Hydrolyse der Phospholipide mit Perchlorsäure wurde nach *Bartlett* (10) durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte durch eine aus Analysen verschiedener KH₂PO₄-Lösungen erstellten Standardkurve.

Ergebnisse

Optimale Sphingomyelinaseaktivität

Zur Überprüfung der zur Sphingomyelinspaltung optimalen Bedingungen wurde der Reaktionsansatz nach Zusatz von Sphingomyelinase und Inkubation delipi-

diert und nicht hydrolysiertes Sphingomyelin sowie N-Acyl-sphingosin als Reaktionsprodukt dünnschichtchromatographisch aus dem Lipidextrakt abgetrennt. Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Lipidextrakte von Inkubationsansätzen, die 1 U Sphingomyelinase und etwa 200 µg Sphingomyelin pro Reaktionsansatz enthielten, ließ kein ungespaltenes Sphingomyelin erkennen (untere Nachweisgrenze für Sphingomyelin 0,15 µg). Wurde zur Inkubation eine Sphingomyelinaseaktivität von < 0,5 U/Reaktionsansatz eingesetzt, ließ sich ungespaltenes Sphingomyelin dünnschichtchromatographisch nachweisen.

pH-Abhängigkeit der Sphingomyelinspaltung

Sphingomyelin wurde bei einem pH-Wert von ≤ 6,4 und in Gegenwart von 1 U Sphingomyelinase im Reaktionsansatz vollständig hydrolysiert (pH-Optimum 5,9–6,4). Lag der pH-Wert im Inkubationsansatz unter den gewählten Reaktionsbedingungen bei > 7,0, zeigte die dünnschichtchromatographische Auftrennung der entsprechenden Lipidextrakte ungespaltenes Sphingomyelin.

Ohne das Detergens Natriumdodecylsulfat erfolgte unter den gewählten Inkubationsbedingungen nur eine unvollständige Sphingomyelinhydrolyse. Die Dünnschichtchromatographie des entsprechenden Lipidextraktes ergab einen noch positiven Sphingomyelinnachweis. Wurde die Inkubation unter sonst gleichen Bedingungen in Anwesenheit von 0,1 g/l Natriumdodecylsulfat durchgeführt, erfolgte eine vollständige Sphingomyelinhydrolyse. Detergensenkonzentrationen ≥ 0,5 g/l bewirkten eine Hemmung der Sphingomyelinhydrolyse.

Enzymatische Cholinbestimmung

Reaktionsverlauf

Der Reaktionsverlauf der enzymatischen Cholinbestimmung ist in Abbildung 1 dargestellt. Nach Mischen von Probe bzw. 0,15 mol/l NaCl (Reagenzienleerwert) mit den Coenzymen und Pyruvatkinase/Lactatdehydro-

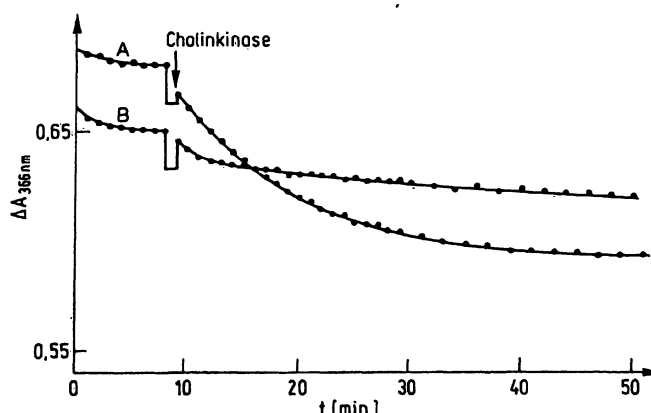


Abb. 1. Reaktionsverlauf der enzymatischen Cholinbestimmung: Reaktionsverlauf des Probenansatzes (A) und Reagenzienleerwertansatzes (B) (0,15 mol/l NaCl).

genase beobachtet man eine „Vorreaktion“, die nach etwa 10 Minuten Inkubationszeit beendet ist. Die nach Zugabe von Cholinase ausgelöste Absorptionsabnahme ist nach etwa 20 Minuten beendet. Der nach Ablauf der Reaktion weiter zu beobachtende „Schleich“ (weitere gleichmäßige Absorptionsabnahme) war beim Probenansatz und Reagentienleerwertansatz unterschiedlich; daher ist eine dritte Absorptionsmessung (A_3) notwendig.

Reaktionsbedingungen der enzymatischen Cholinbestimmung

Die Bedingungen der Umwandlung von Cholin in Phosphorylcholin wurden durch Zugabe von [Methyl- ^{14}C]-Cholin zum denaturierten, nach Sphingomyelinase erhaltenen Zentrifugationsüberstand überprüft. Die danach im Testansatz vorhandene Cholin-Konzentration betrug etwa das Tausendfache der normalerweise im Sphingomyelinansatz freigesetzten Cholin-Konzentration, so daß die Umwandlung von [^{14}C]Cholin in

Phosphoryl[^{14}C]Cholin nicht quantitativ erfolgen konnte. Ein Maß für die Umwandlung war die Radioaktivitätsverteilung nach papierchromatographischer Auftrennung des Inkubationsansatzes. Wie Abbildung 2 zeigt, lag das pH-Optimum der Cholinase bei pH 8–9. Wir fanden nach Aufarbeitung der bei diesen pH-Werten durchgeführten Reaktionsansätze nur einen relativen Anteil von 0,13–0,15 der Gesamtradioaktivität in der [^{14}C -Methyl]Cholin-Fraktion, bei Aufarbeitung des bei pH 6 durchgeführten Reaktionsansatzes dagegen einen relativen Anteil von etwa 0,45 an der Gesamtradioaktivität.

Zur Überprüfung der Detergentienabhängigkeit der Cholinase wurde die Konzentration von Natriumdodecylsulfat zwischen 0,1 g/l und 5 g/l eingestellt. Ohne Natriumdodecylsulfat befand sich ein relativer Anteil von 0,45 der Gesamtradioaktivität in der Phosphoryl[^{14}C]Cholin-Fraktion, während bei Inkubation mit 0,1 g/l Natriumdodecylsulfat ein relativer Anteil von 0,60 und bei Inkubation mit 1 g/l Natriumdodecylsulfat ein relativer Anteil von 0,65 der Gesamtradioaktivität in

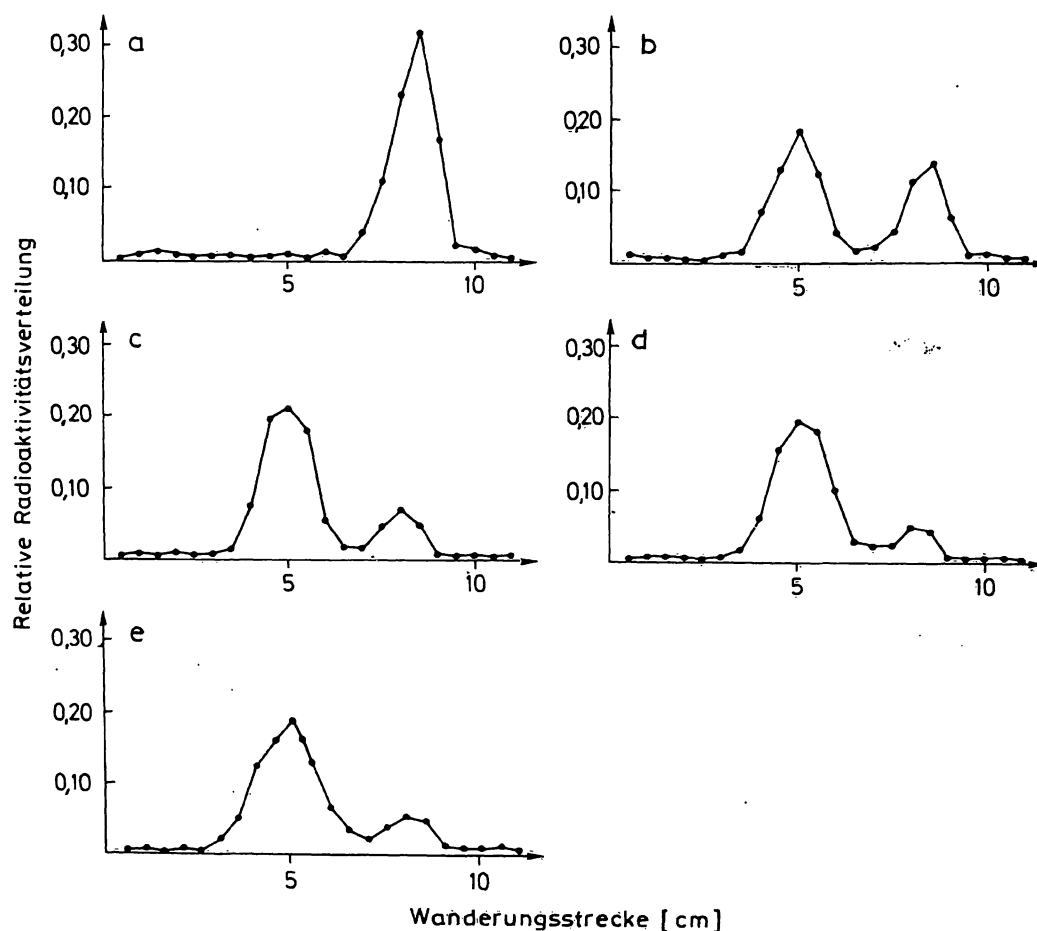


Abb. 2. pH-Abhängigkeit der Cholinase-Reaktion. Relative Radioaktivitätsverteilung von Phosphoryl[^{14}C]Cholin (1. Peak) und [^{14}C]Cholin (2. Peak) nach papierchromatographischer Auftrennung des Inkubationsansatzes.

- a = Inkubation in Abwesenheit von Cholinase;
- b = Inkubation bei pH 6,0;
- c = Inkubation bei pH 7,0;
- d = Inkubation bei pH 8,0;
- e = Inkubation bei pH 9,0.

dieser Fraktion gefunden wurde (Abb. 3). Bei höheren Konzentrationen von Natriumdodecylsulfat (5–10 g/l) wurde die Cholinkinasereaktion vollständig gehemmt.

Linearität der Bestimmungsmethode

Die gemessenen Absorptionsdifferenzen waren in dem geprüften Bereich zwischen 20 bis 100 μ l Probe (Apolipoprotein B-freier Fällungsüberstand) pro Inkubationsansatz den zugegebenen Probenvolumina direkt proportional (Abb. 4). Bei Zugabe von mehr als 100 μ l Probe zum Inkubationsansatz kam es im Verlauf der Sphingomyelinspaltungsreaktion zu Trübungen, die sich durch Zentrifugation nicht beseitigen ließen.

Die Linearität der Cholinbestimmung wurde durch Zugabe verschiedener Mengen eines eingewogenen

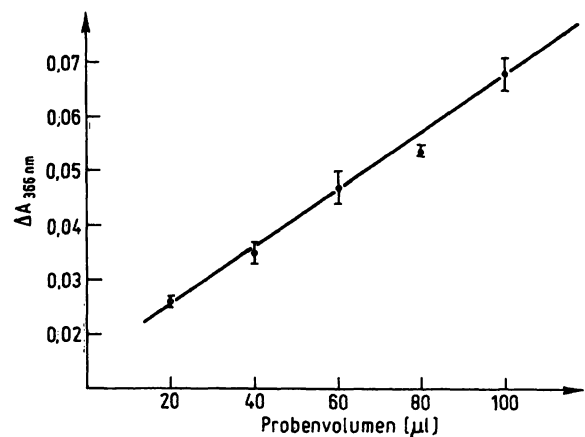


Abb. 4. Abhängigkeit der enzymatischen Cholinbestimmung von dem zum Sphingomyelinbestimmungsansatz zugegebenen Volumen an Apolipoprotein B-freiem Fällungsüberstand von Seren (Mittelwert \pm Standardabweichung von jeweils 4 Ansätzen).

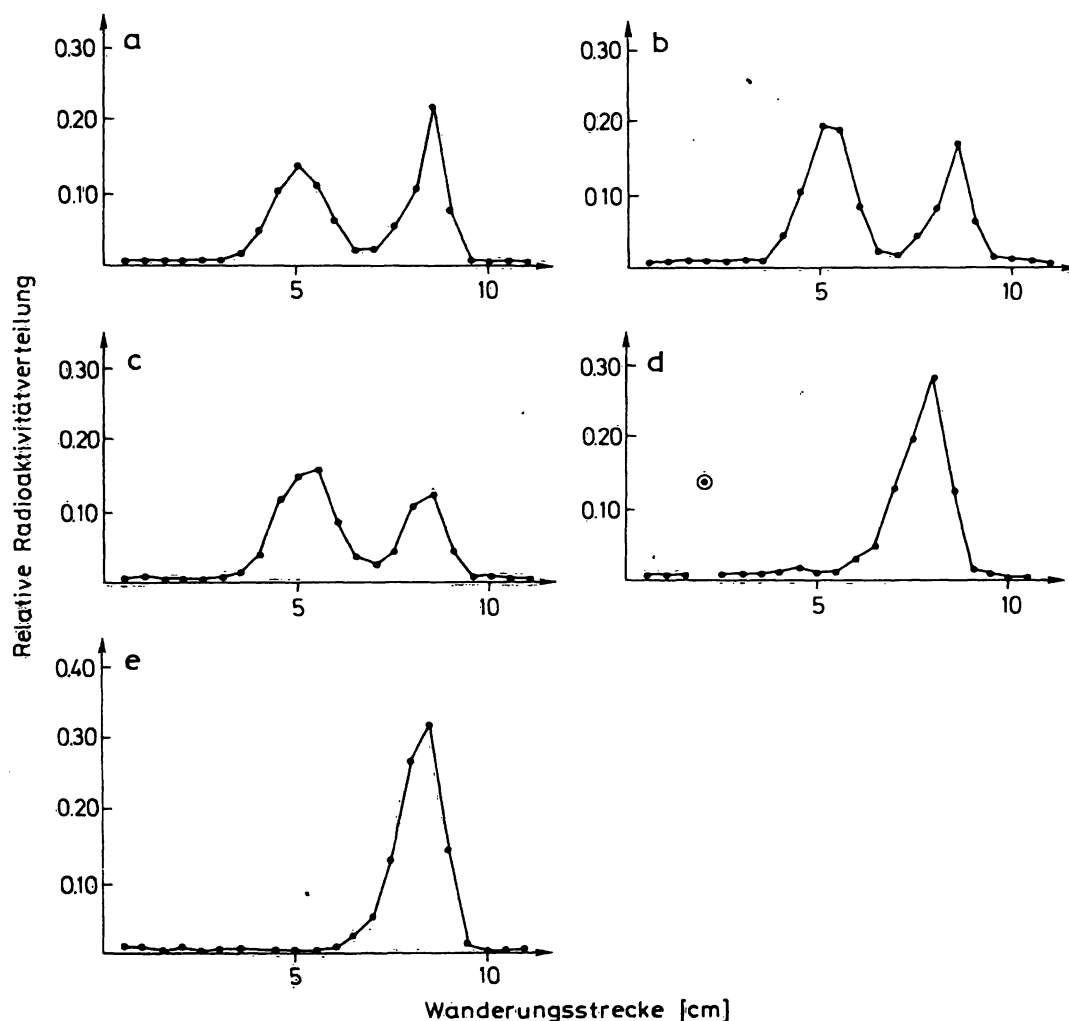


Abb. 3. Abhängigkeit der Cholinkinasereaktion von der Natriumdodecylsulfatkonzentration im Inkubationsansatz. Relative Radioaktivitätsverteilung von Phosphoryl 14 C]Cholin (1. Peak) und 14 C]Cholin (2. Peak) nach papierchromatographischer Auftrennung des Inkubationsansatzes.

- a = Inkubation ohne Zusatz von Natriumdodecylsulfat;
- b = Inkubation in Anwesenheit von 0,1 g/l Natriumdodecylsulfat;
- c = Inkubation in Anwesenheit von 1 g/l Natriumdodecylsulfat;
- d = Inkubation in Anwesenheit von 5 g/l Natriumdodecylsulfat;
- e = Inkubation in Anwesenheit von 10 g/l Natriumdodecylsulfat.

Cholinstandards zum Apolipoprotein B-freien Fällungsüberstand überprüft (Abb. 5). In dem geprüften Bereich war die Wiederfindungsrate zwischen 0,17 und 0,5 μmol Cholin pro Bestimmungsansatz der zugegebenen Cholinmenge proportional. Im Bereich über 0,5 μmol an zugesetztem Cholin ermittelten wir nur einen relativen Anteil von 0,6–0,7 der theoretischen Cholinkonzentration. Offenbar reichen die im Testansatz vorliegenden Reagentienkonzentrationen bei CholinKonzentrationen $> 0,5 \mu\text{mol}$ pro Testansatz nicht mehr für einen vollständigen Reaktionsablauf aus. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß bei Spaltung von HDL-Sphingomyelin die im Testansatz vorliegende Cholinmenge nur etwa 0,02 μmol beträgt.

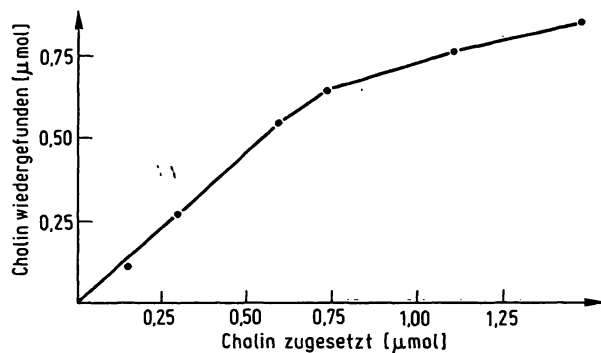


Abb. 5. Linearität der enzymatischen Cholinbestimmung. Abhängigkeit der Cholinwiederfindung von der zum Apolipoprotein B-freiem Fällungsüberstand zugegebenen Cholinmenge.

Vergleich der Sphingomyelinkonzentration in unterschiedlich isolierten HDL-Fraktionen

Die Regressionsanalyse der Meßdaten aus dem Apolipoprotein B-freien Präzipitationsüberstand und aus der durch Ultrazentrifugation isolierten HDL-Fraktion (1,063–1,21 kg/l) zeigte, daß die Sphingomyelinkonzentrationen im Apolipoprotein B-freien Fällungsüberstand mit den Sphingomyelinkonzentrationen in der durch Ultrazentrifugation isolierten HDL-Fraktion relativ gut übereinstimmen ($r = 0,900$, $y = 1,06x - 0,04$, $n = 32$) (Abb. 6).

Richtigkeit der Sphingomyelinbestimmung

Die Richtigkeit der enzymatischen Sphingomyelinbestimmung wurde anhand der Sphingomyelinwerte überprüft, die mit der konventionellen Standardmethode (dünnschichtchromatographische Sphingomyelintrennung nach Lipidextraktion, Phosphatbestimmung nach Hydrolyse mit Perchlorsäure) ermittelt wurden. Da Vorversuche ergaben, daß die aus dem Apolipoprotein B-freien Fällungsüberstand isolierten Sphingomyelinfraktionen mit Phosphorwolframsäure kontaminiert waren, konnte die konventionelle Standardmethode nur bei HDL-Fraktionen eingesetzt

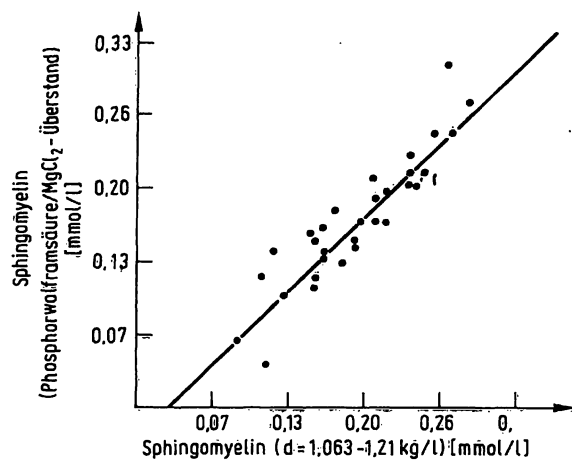


Abb. 6. Regressionsanalyse der Sphingomyelinwerte, die aus der durch Ultrazentrifugation isolierten HDL-Fraktion (1,063–1,21 kg/l) und der durch Fällung Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine isolierten Überstandsfraktionen ermittelt wurden; $y = 1,06x - 0,04$, $r = 0,900$, $n = 32$.

werden, die durch sequentielle Ultrazentrifugation (1,063–1,21 kg/l) isoliert worden waren. Wie Abbildung 7 zeigt, findet man bei Gegenüberstellung der mit der enzymatischen Sphingomyelinbestimmung und der konventionellen chemischen Methode ermittelten Werte eine gute Übereinstimmung ($r = 0,94$, $y = 0,867x + 0,02$, $n = 20$).

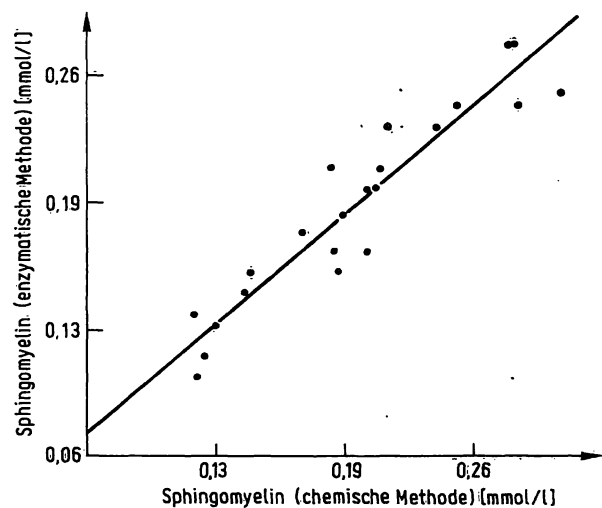


Abb. 7. Regressionsanalyse der Sphingomyelinwerte, die mit der chemischen Methode und der enzymatischen Methode analysiert wurden; $y = 0,867x + 0,02$, $r = 0,94$, $n = 20$.

Präzision der Sphingomyelinbestimmung

Wir fanden bezüglich der Präzision in der Serie einen Variationskoeffizienten von 5,7% ($\bar{x} = 0,241 \text{ mmol/l}$, $n = 21$).

Die Präzision von Tag zu Tag wurde von uns mit Serumproben ermittelt, die aus einem frischen Poolserum in

Aliquoten abgefüllt und bei -20°C gelagert wurden. In Vorversuchen wurde ermittelt, daß die bei -20°C tiefgefrorenen Seren über den von uns geprüften Zeitraum von 4 Wochen keine Unterschiede der Sphingomyelinwerte im Apolipoprotein B-freien Überstand im Vergleich zu frischen Seren aufwiesen. Der aus diesen Proben ermittelte Variationskoeffizient von Tag zu Tag betrug 5,3% ($\bar{x} = 0,195 \text{ mmol/l}$, $n = 12$).

Diskussion

Im Rahmen der Verfügbarkeit spezifisch spaltender Phospholipasen sind in letzter Zeit verschiedene Methoden zur Quantifizierung von cholinhaltigen Phospholipiden im Fruchtwasser und im Blutserum entwickelt worden (3, 4, 5, 11, 12). Zur Hydrolyse der cholinhaltigen Phospholipide wird entweder Phospholipase D aus *Streptomyces chromofuscus*, Phospholipase C aus *B. cereus* oder Sphingomyelinase aus *B. cereus* eingesetzt und Cholin aus dem Hydrolyseprodukt Phosphorylcholin mittels alkalischer Phosphatase freigesetzt. Die Analytik des Cholins erfolgt entweder mittels Cholinase im optischen Test (3) bzw. bei Verwendung von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$ durch Abtrennung von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{Phosphorylcholin}$ mittels Anionenaustauscherchromatographie (4) oder kolorimetrisch mittels Cholinoxidase und Peroxidase (5, 12). Die von uns zur Sphingomyelinbestimmung im Apolipoprotein B-freien Überstand nach Fällung von Seren mit Phosphorwolframsäure/ MgCl_2 entwickelte Methode basiert auf der Verwendung von Sphingomyelinase und Cholinase. Die erzielten Analyseergebnisse stimmen gut mit den Sphingomyelinwerten überein, die durch die konventionelle Standardmethode ermittelt wurden (dünnschichtchromatographische Sphingomyelintrennung, Phosphatbestimmung nach Hydrolyse mit Perchlorsäure). Die Konzentration des dem Testansatz zugesetzten Detergens Natriumdodecylsulfat wurde von uns so gewählt, daß einerseits eine vollständige Sphingomyelinspaltung gewährleistet war und andererseits eine Hemmung der Cholinase vermieden wurde.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß der Sphingomyelingehalt im Fällungsüberstand nach Präzipitation Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine gut mit dem Sphingomyelingehalt in der durch Ultrazentrifugation getrennten HDL-Fraktion übereinstimmt. Dies läßt darauf schließen, daß während der Fällung Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine keine wesentliche Änderung im Sphingomyelingehalt der HDL auftritt bzw. der Sphingomyelinanteil der HDL-Partikel nicht mitpräzipitiert wird. Die erzielten Ergebnisse zeigen weiterhin, daß in dem geprüften Bereich zwischen

20–100 μl Probe/Bestimmungsansatz (Fällungsüberstand nach Fällung Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine mit Phosphorwolframsäure/ MgCl_2) keine Beeinflussung der Bestimmungsmethode durch die Fällungsreagenzien auftritt.

Die ermittelten Variationskoeffizienten für die Präzision in der Serie und von Tag zu Tag liegen mit etwa 6% durchaus in einem akzeptablen Bereich. Eine wesentliche Erhöhung der Präzision ist zur Zeit nicht möglich, da die kommerziell verfügbare Cholinase nicht zu beseitigende Nebenaktivitäten an Hexokinase enthält (13). In Glucose-haltigen Proben wie Serum oder Serumfraktionen (Apolipoprotein B-freier Fällungsüberstand) kommt es deshalb zu einer unspezifischen NADH-Konzentrationsabnahme („Schleich“). Wir fanden mit verschiedenen Chargen Cholinase unspezifische Absorptionsabnahmen zwischen 0,02–0,06/10 min Inkubation. Der durch die Hexokinase-Reaktion hervorgerufene „Schleich“ wird zwar durch den Abzug der Absorptionsdifferenz $A_2 - A_3$ korrigiert. Es hat sich jedoch bei der Überprüfung von Präzision und Richtigkeit als sinnvoll erwiesen, den zwischen Test und Reagenzienleerwertansatz bestehenden „Schleich-Unterschied“ durch Zugabe einer der Substratsättigung der Hexokinase entsprechenden Glucosekonzentration zum Cholinbestimmungsansatz auszugleichen.

Die von uns entwickelte enzymatische Bestimmungsmethode für HDL-Sphingomyelin ist trotz der relativ hohen Analysendauer erheblich schneller und weniger aufwendig als das bisherige konventionelle Bestimmungsvorgehen. Die Reagenzienkosten der enzymatischen Sphingomyelinanalyse liegen zur Zeit bei etwa DM 5,30 pro Test, bedingt durch die relativ teure Sphingomyelinase. Die Analytik des freigesetzten Cholins läßt sich im Prinzip durch die Verwendung von Cholinoxidase und Peroxidase anstatt von Cholinase vereinfachen. Die kolorimetrische Cholinbestimmung ist jedoch zur Zeit noch kostengünstiger als die beschriebene Cholinbestimmung im optischen Test. Angesichts der ermittelten Daten bezüglich Präzision und Richtigkeit ist der Einsatz der enzymatischen HDL-Sphingomyelin-Bestimmungsmethode trotz der zur Zeit noch relativ hohen Analysenkosten zumindest für Forschungszwecke zu empfehlen. Eine breite Anwendung des enzymatischen HDL-Sphingomyelinbestimmungsverfahrens in der Routine ist von der klinischen Relevanz zukünftiger Ergebnisse abhängig.

Acknowledgement

Supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft and the Bundesministerium für Forschung und Technologie, Bonn.

Literatur

1. Assmann, G. & Schriewer, H. (1981) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 19, 1–6.
2. Assmann, G., Schriewer, H. & Funke, H. (1981) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 19, 273–278.

3. Diedrich, K., Hepp, S., Welker, H., Krebs, D., Beuttler, H.-O. & Michal, G. (1979) *Geburtsh. Frauenheilk.* **39**, 849–856.
4. McDonald, L. J., Robin, N. I. & Siegel, L. (1981) *Clin. Chem.* **27**, 410–416.
5. Takayama, M., Itoh, S., Nagasaki, T. & Tanimizu, I. (1977) *Clin. Chim. Acta* **79**, 93–98.
6. Assmann, G., Schriewer, H. & Oberwittier, W. (1980) *Klin. Wochenschr.* **58**, 757–765.
7. Assmann, G., Funke, H. & Schriewer, H. (1982) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **20**, 287–289.
8. Sundler, R. & Akesson, B. (1975) *Biochem. J.* **146**, 309–315.
9. Skipski, V. P., Peterson, R. F. & Barclay, M. (1964) *Biochem. J.* **90**, 374–378.
10. Bartlett, G. R. (1959) *J. Biol. Chem.* **24**, 466–468.
11. Quershi, M. J., Murphy, G. M. & Dowling, R. H. (1980) *Clin. Chim. Acta* **105**, 407–410.
12. Gurantz, D., Laker, M. F. & Hofman, A. F. (1981) *J. Lipid. Res.* **22**, 373–376.
13. Ziegenhorn, J., persönliche Mitteilung.

Prof. Dr. G. Assmann
Zentrallaboratorium der Med. Einrichtungen
Westfälische Wilhelms-Universität
Westring 3
D-4400 Münster